대한간학회지 제 6 권 제 2 호 2000 ; 147-155

사염화탄소로 급성 간손상이 유발된 흰쥐에서 혈청 및 간조직의 Transforming Growth Factor-β_1의 변화와 비타민 E의 효과

연세대학교 의과대학 내과학교실, 병리학교실[1], 임상병리학교실[2]

이정일, 이관식, 정준표, 박영년[1], 이세준, 한광협, 전재윤, 이상인, 문영명, 김현숙[2]

Abstract

The Change of Transforming Growth Factor-β_1 Expression and the Effect of Vitamin E in the Acute Rat Liver Injury with Carbon Tetrachloride

Jung Il Lee, Kwan Sik Lee, Jun Pyo Chung, Young Nyun Park[1], Se Joon Lee, Kwang Hyub Han, Chae Yoon Chon, Sang In Lee, Young Myoung Moon, Hyon-Suk Kim[2]

Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Department of Pathology[1], Department of Clinicopathology[2]

Background/Aims: The evaluation of the relationship between oxidative stress induced by acute carbon tetrachloride (CCl_4) administration and transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1), and the investigation of temporal patterns of serum alanine aminotransferase (ALT) and TGF-β_1 expression which may clarify the pathogenesis of CCl_4 induced liver injury and thus the mechanism of liver fibrogenesis. The aim of this study was to investigate TGF-β_1 expression in rats with acute CCl_4 injury and effect of vitamin E (vit. E) on TGF-β_1 expression. **Methods:** Sixty male Sprague-Dawley rats had a single intraperitoneal injection of CCl_4, of which 30 rats had daily intraperitoneal injection of vit. E, starting from 2 days before CCl_4 treatment until the time of their sacrifice. The group of rats with CCl_4 injection only was designated as group 1 and the group of rats with vit. E combined treatment was designated as group 2. Five rats from each group were sacrificed before and 8, 16, 32, 48, 60 hours after CCl_4 injection, and their serum ALT, serum TGF-β_1, and hepatic expression of TGF-β_1 were examined. **Results:** The serum ALT levels were highest at 32 hours after CCl_4 injection in both groups, serum TGF-β_1 levels did not show any statistically significant changes after CCl_4 injection in both groups, and TGF-β_1 expression in the livers was highest at 32 hours after CCl_4 injection in both groups. In the multiple regression analysis of vit. E's effect on serum ALT levels, serum TGF-β_1 levels and hepatic TGF-β_1 expression, only serum ALT level ($p=0.049$) and hepatic TGF-β_1 expression ($p=0.015$) showed statistically significant suppression. **Conclusion:** Oxidative stress seems to play a role in the pathogenesis of hepatic fibrogenesis by increasing TGF-β_1 expression in early acute liver damage. and vit. E may be effective in reducing acute liver injury and hepatic fibrogenesis.
(Korean J Hepatol 2000;6:147-155)

Key Words: Carbon tetrachloride, Acute liver injury, TGF-β_1, Vitamin E

◇ 접수 2000년 2월 9일; 수정본 접수 2000년 4월 14일; 승인 2000년 4월 21일

◇ Abbreviations: TGF-β_1, transforming growth factor-β_1; CCl_4, carbon tetrachloride; ALT, alanine aminotransferase; Vit E, vitamin E.

◇ 책임저자 : 이관식, 서울특별시 강남구 도곡동 146-92 영동세브란스 병원 내과 (우) 135-270
Phone: 3497-3314; Fax: 3463-3882; Email: leeks519@yumc.yonsei.ac.kr.

서 론

사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl_4)의 단기 투여는 실험적인 간손상 및 간섬유화를 일으키는 데 널리 이용되고 있다.[1] CCl_4가 간손상 및 간섬유화를 일으키는 정확한 작용 기전은 아직 알려져 있지 않으나 CCl_4의 산화제(pro-oxidant)로서의 역할이 중요시되고 있다. 즉 CCl_4가 간내의 microsomal cytochrome P-450에서 trichloromethyl free radical ($CCl_3^{\cdot}$)을 형성하고 그 결과 trichloromethylperoxy radical ($CCl_3O_2^{\cdot}$)을 형성하며, 이 radical이 직접 혹은 간접적으로 세포막의 지질 또는 다른 분자들에 손상을 유발한다는 것이다.[2] 이와 관련하여 CCl_4로 급성 간손상이 유발된 흰쥐에서 지질의 과산화(lipid peroxidation)를 나타내는 malondialdehyde의 증가가 collagen α_1(I) mRNA의 발현과 유의한 상관관계를 보였다고 한다.[3]

Transforming growth factor-β_1(TGF-β_1)은 세포의 성장 및 대사를 조절하는 사이토카인의 하나로 특히 조직의 손상 및 염증반응 이후에 세포외 기질의 생성에 중요한 역할을 한다.[4,5] 여러 경우의 급성 및 만성 간손상 시에 TGF-β_1의 발현 증가가 type I collagen의 발현증가와 동반되고, 항 TGF-β_1 항체로 TGF-β_1 작용을 억제하면 간섬유화도 억제된다는 점에서 이 사이토카인의 증가는 일반적으로 간섬유화의 시작으로 알려져 있다.[1,6-8] CCl_4에 의한 급성 간손상 모델에서 초기에 염증반응에 의하여 Kupffer세포를 비롯한 비실질세포가 다량 증가하면서 TGF-β_1을 포함한 여러 사이토카인들이 분비되고 α_1(I) procollagen의 발현이 증가되어, 염증세포에서 유래한 TGF-β_1에 의한 paracrine effect로 간성상세포(hepatic stellate cell)에서의 발현증가가 이루어지는 것으로 생각되지만,[7,9] Kupffer세포의 작용을 배제한 간세포와 간성상세포의 혼합배양에서도 CCl_4 투여시 collagen α_1(I) mRNA의 발현이 증가되었다는 보고도 있다.[10] CCl_4에 의한 급성 간손상 모델에서 어느 시기에 간손상이 유발되고 TGF-β_1이 발현되는지 시간에 따른 변화도 확실하게 정립되어 있지 않다.

CCl_4의 장기 투여에 의한 만성 간질환 모델에서 항산화제인 비타민 E 투여가 간경변의 유발을 억제한다는 보고[11,12]가 있고, CCl_4의 단기 투여에 의해 유발된 간섬유화에서 급성 산화성 스트레스(oxidative stresss)와 간섬유화 인자인 TGF-β_1이 중요한 역할을 한다는 것은 알려져 있으나 이 두 인자 사이의 관계나 이들에 미치는 비타민 E의 효과에 대한 보고는 드물다. 그러나 니켈에 의한 급성 간손상이나 철에 의한 만성 간손상 등에서 지질과산화의 산물이 증가하고 이에 따라 TGF-β_1이 증가했다는 보고[13,14]를 볼 때, CCl_4에 의한 급성 간손상에서도 산화성 스트레스와 TGF-β_1 사이에 의미있는 상관관계가 있을 것으로 추정되고, 따라서 항산화제인 비타민 E도 TGF-β_1에 영향을 미치리라 생각된다.

본 연구에서는 흰쥐에서 CCl_4 일회 투여에 의한 급성 간손상시 어느 시기에 간손상이 유발되고 TGF-β_1이 발현되는지 관찰하여 급성 간손상과 TGF-β_1의 관계를 알아보고자 하였으며, 또한 항산화제인 비타민 E의 투여가 이에 미치는 영향을 관찰하여 산화성 스트레스와 TGF-β_1의 관계를 간접적으로 알아보고자 하였다.

대상과 방법

1. 대상

몸무게 100 g 정도인 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐 60마리를 30마리씩 두 군으로 나누어 1군은 CCl_4와 광유(mineral oil)를 1대 3 부피비로 혼합하여 kg당 2 mL씩을 복강내에 투여하였고 2군은 동일한 방법으로 CCl_4를 복강내 투여하고, CCl_4 투여 2일 전부터 희생시킬 때까지 매일 kg당 200 mg의 비타민 E (α-tocopherol: Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)를 복강내에 투여하였다. 각 군에서 CCl_4 투여 전, 투여 후 8시간, 16시간, 32시간, 48시간 및 60시간에 각각 5마리씩의 흰쥐를 희생시켜 간조직을 적출하였고, 적출한 간조직은 10% 포르말린 용액에 즉시 고정시켰다.

각각의 흰쥐를 희생시키기 전에 하대정맥에서 전혈 1 ml를 채취하고, 3000 g에서 10분간 원심분리한 후 혈청을 분리하여 -70℃에서 냉동보관하였다.

2. 방법

1) 혈청 ALT치

흰쥐의 혈청 ALT치는 Hitachi사의 747형 자동분석기(Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 정량적으로 측정하였다.

2) 혈청 TGF-β_1치

혈청 TGF-β_1치는 쥐의 혈청 TGF-β_1과 호환성이 있는 human TGF-β_1 immunoassay kit (R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA.)를 이용하여 측정하였다. 혈청 0.1 mL에 0.1 mL의 2.5 N acetic acid와 10 M urea가 혼합된 용액을 섞어 상온에 10분간 방치한 후 다시 0.1 mL의 2.7 N NaOH와 1 M HEPES 혼합용액으로 중화시켰다. Recombinant human TGF-β_1 soluble receptor type II로 미리 coating된 microplate에 준비된 혈청을 10배 희석하여 200 μL씩 각각의 well에 넣고 3시간동안 상온에 방치한 후 세척하였다. 이 후 well을 완충액으로 3차례 더 세척하고 200 μL의 다클론성 TGF-β_1 항체로 각각의 well을 채운 후 1.5시간동안 상온에 방치하고 세척하였다. 완충액으로 3차례 더 세척하고 50 μL의 2 N sulfuric acid로 각각의 well을 채운 후 30분간 상온에 방치하였다. Spectrophotometer(Cecil, England)를 이용하여 450 nm에서 혈청 TGF-β_1을 측정하였다.

본 실험에서 사용된 immunoassay kit에서는 TGF β isoform인 TGF-β_2와의 교차반응도(cross-reactivity)가 0.08%였고 TGF-β_3와의 교차반응도는 0.12%였으며 실험내 변이도(intraassay variability)와 실험간 변이도(interassay variability)는 각각 5.3%와 8.8%였다.

3) 간조직의 TGF-β_1에 대한 면역조직화학적 검사

간조직의 TGF-β_1에 대한 면역조직화학적 검사를 위해 일차 항체로 다클론성 rabbit anti-human TGF-β_1 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하였고, 이차 항체로 rabbit anti-mouse 항체(DAKO, Carpinteria, CA, USA)를 사용하였으며, 시그널 탐지에는 catalyzed signal amplification system(DAKO Catalyzed Signal Amplification System, Peroxidase, Carpinteria, CA, USA)을 이용하였다.

포르말린에 고정하여 파라핀에 포매된 흰쥐의 간조직을 탈파라핀하기 위하여 xylene에 20분간 담그고 100% ethanol에 10분, 70% ethanol에 5분간 담근 후 흐르는 물에 30초간 세척하였다. 이후 3% 과산화수소를 사용하여 8분간 처리한 후 증류수에 3분간 세척하였고 인산염 완충액과 섞인 serum-free protein으로 8분간 처리하여 비특이적 단백질을 차단하였다. 일차 항체를 1:1000으로 희석하여 30분간 실온에서 반응시켰고 0.05 M Tris-HCl, 0.3 M NaCl 및 0.1% Tween 20이 섞인 Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) 완충액으로 3분씩 3차례 세척한 후 이차 항체인 biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin으로 15분간 처리한 후 TBST 완충액으로 세척하였다. Biotin molecule의 증폭을 위해 biotinyl tyramide와 과산화수소가 섞인 인산염 완충액으로 15분간 처리하여 세척하였고 streptavidin이 결합된 peroxidase로 15분간 처리하였다. 과산화수소의 기질로서 3-amino-9-ethyl-carbazole in N,N-dimethyl formamide (AEC) 색소용액에 5분간 반응시켰고 Harris hematoxylin으로 대비 염색하였다.

결과 판독은 광학 현미경으로 400배율 시야에서 TGF-β_1 염색이 양성인 세포를 세었고 각 조직당 10부위를 관찰하여 평균을 구하였다.

4) 통계처리

모든 결과는 평균±표준오차로 표시하였다. 같은 군내에서 CCl_4 투여 전과 각각의 시간에 따른 비교는 Kruskal-Wallis test를 이용하였고 p값이

0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다. 또한 비타민 E의 혈청 ALT 치, 혈청 TGF-β_1치, 및 간조직에서의 TGF-β_1 표현에 미치는 영향을 보기 위해, 각각의 수치를 제곱근으로 변화시켜 정규 분포화 한 후, 회귀분석(multiple regression)을 시행하여 p값이 0.05 미만인 경우에 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 혈청 ALT치의 변화

혈청 ALT (IU/L)치는 1군에서 CCl_4 투여 전과 투여 후 8, 16, 32, 48, 및 60시간에 각각 74±20.7, 170±54.3, 258±83.5, 1,178±381.3, 274±174.0, 92±74.0 이었고, 2군에서는 각각 64±21.9, 152±58.9, 156±62.3, 576±141.5, 70±35.4, 62±55.4 이었다. 두 군 모두에서 CCl_4 투여 후 32시간에 혈청 ALT 치가 가장 의미 있게 증가되었고($p<0.05$)(그림 1), 비타민 E 투여에 의해 혈청 ALT 치의 증가가 의의 있게 억제되었다($p=0.049$)(표 1).

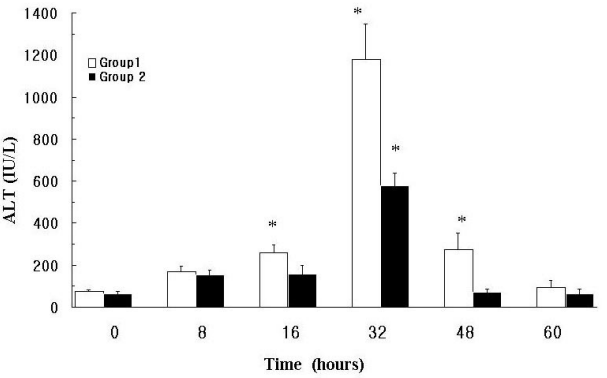

Figure 1. Change of serum alanine aminotransferase (ALT) concentrations according to time sequences in the group with carbon tetrachloride (CCl_4) injection (Group 1) and in the group with vitamin E supplementation before and after CCl_4 injection (Group 2). Results are mean±SEM. There were statistically significant differences in ALT level of 16, 32, 48 hours after CCl_4 injection in group 1 and ALT level of 32 hours after CCl_4 injection in group 2 compared with that of time 0 (*$p<0.05$).

2. 혈청 TGF-β_1치의 변화

혈청 TGF-β_1 (pg/ml)치는 1군에서 CCl_4 투여 전 및 투여 후 8, 16, 32, 48, 60시간에 각각 1,664.37±135.55, 1,654.21±144.20, 1,924.18±52.23, 1,763.05±82.33, 1,677.52±111.77, 1,711.50±189.53 이었고, 2군에서는 각각 1,548.84±205.82, 1,731.64±164.34, 1,511.74±248.77, 1,078.64±176.68, 1,102.10±368.02, 1,532.63±298.95 이었다. 1군에서는 CCl_4 투여 후 16시간에 가장 높은 혈청 TGF-β_1 치를 나타냈고 이후에는 감소하는 추세였으며, 2군에서는 CCl_4 투여 후 8시간에 가장 높았으나 두 군 모두 CCl_4 투여 전에 비해 통계학적으로 유의하지 않았다(그림 2). 또한 비타민 E의 투여에 의해 혈청 TGF-β_1 치는 의의 있게 억제되지 못 하였다($p=0.11$)(표 1).

3. 간조직에서의 TGF-β_1의 발현정도

면역조직화학적 검사상 400배율 시야당 TGF-β_1에 양성을 보인 세포수는 1군에서 CCl_4 투여 전 및 투여 후 8, 16, 32, 48, 60시간에 각각 0.00±0.00, 1.97±0.99, 2.51±0.74, 11.71±0.64, 5.27±0.43, 2.43±0.17 이었고, 2군에서는 각각 0.00±0.00, 1.43±0.42, 1.76±0.59, 2.26±0.44, 0.88±0.54, 0.88±0.37 이었다. 1군에서는 CCl_4 투여 전에 비하여 투여 후 32, 48시간에 TGF-β_1 양성인 세포가 유의하게 증가하였으며, 2군에서는 CCl_4 투여 전에 비하여 투여 후 32시간에 TGF-β_1 양성인 세포가 유의하게 증가하였고($p<0.05$),

Table 1. Multiple Regression Analysis of Factors Influenced by Vitamin E

	β	95% Confidence Interval	P Value	R Square
Serum ALT level[a]	0.468	0.065 21.547	0.049*	0.61
Serum TGF-β_1[b]	0.474	-9.244 62.986	0.11	0.62
Serum TGF-β_1[c]	0.483	0.263 1.966	0.015*	0.75

ALT, Alanine Aminotransferase; TGF-β_1, Transforming Growth Factor-β_1;
[a,b,c], All dependent variables were transformed in square rooted values; *, $p<0.05$

두 군 모두에서 CCl_4 투여 후 32시간에 TGF-β_1의 발현이 가장 높게 나타났다($p<0.05$). 비타민 E 투여에 의해 간조직에서의 TGF-β_1 발현은 유의하게 억제되었다($p=0.015$)(표 1)(그림 4A, 4B).

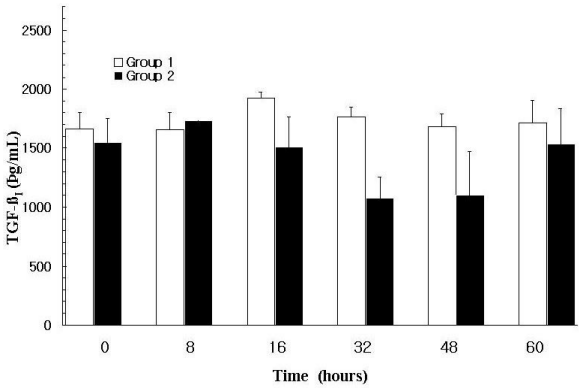

Figure 2. Change of serum transfroming growth factor-β_1 (TGF-β_1) concentrations according to time sequences in the group with carbon tetrachloride (CCl_4) injection (Group 1) and in the group with vitamin E supplementation before and after CCl_4 injection (Group 2). Results are mean±SEM, expressed in pg/ml. There were no significant changes in the TGF-β_1 levels compared to the time 0 in both groups.

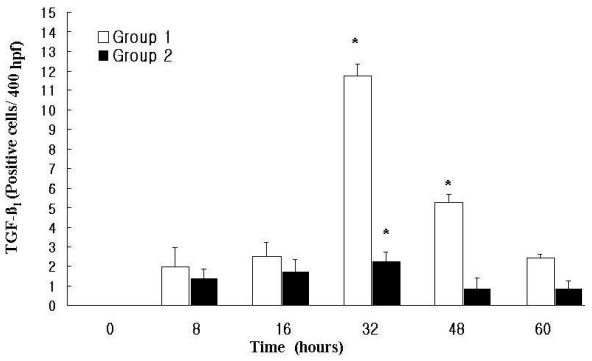

Figure 3. Transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) expression in the liver of the group with carbon tetrachloride (CCl_4) injection (Group 1) and of the group with vitamin E supplementation before and after CCl_4 injection (Group 2). Results are mean±SEM, expressed in positive cells/400 hpf (high power field). There were no positively stained cells at the time 0 in both groups. There were statistically significant differences in number of positively stained cells at 32, 48 hours after CCl_4 injection in group 1 and at 32 hours after CCl_4 injection in group 2 compared with that of time 0 (*$p<0.05$).

고 찰

본 연구에서는 CCl_4에 의해 유발된 급성 간손상에서 혈청 ALT치가 CCl_4 투여 후 서서히 증가하여 32시간 후에 최고치를 보였고 이후에는 감소하는 추세를 보였으며, 간조직에서의 TGF-β_1 발현

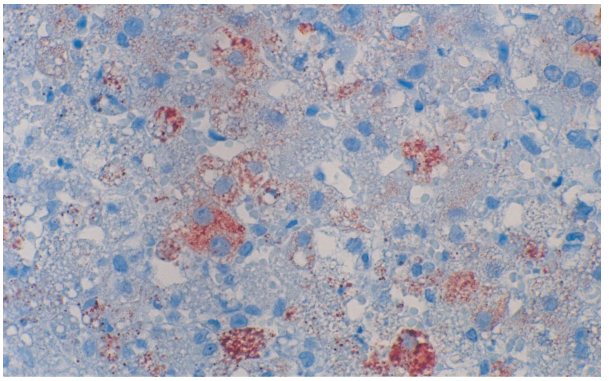

Figure 4A. Immunohistochemical study for transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) in the liver of male Sprague-Dawley rats 32 hr after carbon tetrachloride (CCl4) injection only (LSAB, X400).

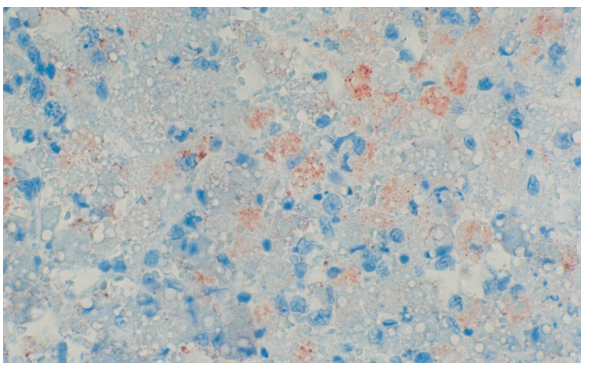

Figure 4B. Immunohistochemical study for transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1) in the liver of male Sprague-Dawley rats 32 hr after carbon tetrachloride (CCl_4) injection with vitamin E supplementation before and after CCl_4 injection (LSAB, X400).
The number of TGF-β_1 positive cells with brownish cytoplasmic expression was significantly lower in group 2 (B) compared to group 1 (A).

도 이와 비슷한 양상을 보여 CCl_4 투여 후 32시간에 가장 높은 발현을 보였고 이후에는 감소하였다. 이러한 결과는 기존의 연구에서 CCl_4로 급성 간손상을 유발시켰을 때 혈청 ALT치 및 간조직에서의 TGF-β_1 발현이 CCl_4 투여 후 48시간에 최고치를 보인 것과는[3,7,9] 차이를 보인다. 그러나

기존의 연구에서는 시간에 따른 변화를 24시간 간격으로 관찰하여 본 연구에서 혈청 ALT치 및 간조직에서의 TGF-β_1 발현이 최고치를 보인 CCl_4 투여후 32시간에서의 수치가 측정되지 않았으므로 본 연구 결과와 차이가 있는 것으로 생각된다.

비타민 E는 지용성 항산화제로서 이미 여러 연구에서 간의 조직학적 변화나 혈청 ALT치는 변화시키지 않는 것으로 알려져 있고,[11,15] 급성 혹은 만성 간손상 및 간섬유화를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다.[11,12,16] 특히 CCl_4에 의한 간손상의 경우 비타민 E가 간세포의 지질과산화를 억제하는 항산화제로서 작용하는 것으로 알려져 있는데 만성적으로 비타민 E가 포함된 식사를 공급받은 흰쥐에게 CCl_4로 급성 간손상을 유발하였을 때 간조직의 CCl_3 free radical의 양은 비타민 E를 공급받지 못한 대조군에 비해 유의한 차이가 없었으므로 비타민 E는 CCl_4가 cytochrome P-450에서 대사되는 것 자체를 억제하지는 못하지만 그 이후의 CCl_4 대사산물인 reactive oxygen species의 작용을 억제하는 것으로 추정되었다.[11]

본 연구에서는 비타민 E에 의해 간조직에서의 TGF-β_1 발현이 억제되었는데, 이는 항산화제인 비타민 E가 CCl_4에 의해 형성된 reactive oxygen species의 작용을 억제하여 간섬유화를 막아주는 과정에서 간섬유화 인자인 TGF-β_1의 억제가 동반됨을 나타내고 산화성 스트레스와 TGF-β_1 사이에 직상관관계가 있음을 간접적으로 시사한다. 또한 일반적으로 TGF-β_1의 발현 증가를 간섬유화의 시작으로 생각하고 있으므로,[7,8,17] 본 연구에서의 비타민 E에 의한 TGF-β_1 발현 억제는 비타민 E가 간섬유화 억제에 효과가 있다는 기존의 연구를 지지하는 결과이며 또한 TGF-β_1 발현의 감소가 비타민 E에 의한 간섬유화 억제의 작용기전일 수 있음을 간접적으로 시사하기도 한다.

본 연구에서는 혈청 ALT치와 간조직에서의 TGF-β_1 발현의 증감이 비슷한 양상을 보였고, 두 인자의 CCl_4에 따른 증가가 비타민 E에 의하여 억제되었다. 손상받은 간세포에 의하여 간성상세포가 활성화되고 이에 따라 type I collagen이 증가한다는 보고[10]와 항산화제인 비타민 E가 간조직의 파괴를 억제한다는 보고[11,18,19] 등은 본 연구 결과에서 혈청 ALT치와 TGF-β_1 발현이 상관관계를 보인 것과 일치하는 소견이다. 그러나 간세포의 효과가 배제된 간성상세포의 단독 배양에서도 산화성 스트레스를 주었을 때 type I collagen이 증가하였고,[20] allyl alcohol에 의한 간손상 시에는 간세포의 파괴가 없었으나 collagen α_1(I) 유전자의 발현은 증가하였으므로,[3] 간세포의 파괴 자체가 간섬유화 유발에 필요충분 조건은 아니라고 생각된다. 그러나 항 TGF-β_1 항체로 TGF-β_1의 작용을 억제하면 간섬유화도 억제된다는 점에서[6,21] 간섬유화에 TGF-β_1은 필수적인 간섬유화 인자라고 생각된다.

CCl_4에 의한 급성 간손상 시 간조직에서의 TGF-β_1 발현이 의미있는 변화를 나타낸 것과는 대조적으로 혈청 TGF-β_1치는 CCl_4 투여에 의한 유의한 변화를 보이지 않았고 비타민 E의 투여에 따른 TGF-β_1치의 억제 효과도 보이지 않았다. 이것은 TGF-β_1이 paracrine 또는 autocrine 기전에 의해 간성상세포의 활성화 및 간섬유화에 영향을 미친다는 것을 시사하는 것으로서 Nakatsukasa[7] 및 Rosensweig[22] 등은 비슷한 결과를 보고한 바 있다. 그러나 니켈에 의한 급성 간손상이나 만성 C형 간염에서 지질과산화 산물 또는 type I collagen의 증가가 혈청 TGF-β_1과 유의한 상관관계가 있다는 보고가 있고,[14,23] 또한 혈청 TGF-β_1치의 측정은 TGF-β_1의 분비가 가능한 혈소판에 의해 오염될 수 있는 것으로 알려져 있기 때문에[24] 혈청 TGF-β_1와 간조직에서의 TGF-β_1 발현과의 관계에 대해서는 아직 더 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 간조직에서의 면역화학적인 TGF-β_1 발현을 볼 때 세포질내 옅은 갈색의 과립상 혹은 미만성의 염색상을 보이며 어느 정도 세포의 형태를 갖춘 것의 수를 광학 현미경 400 배율 시야에서 세었다. 본 연구에서 TGF-β_1 발현을 보기 위하여 이용한 시그널 증폭 시스템의 경우 예민도는 높으나 배경에 대한 비특이적인 염색이 가

능하기 때문에 양성판정을 함에 있어서 엄격하게 세포질에 염색된 것들만을 세었으나 이 경우에 세포외 기질에 표현된 TGF-β_1을 간과하게 되는 것이 문제점이다. 양성으로 판정된 세포들은 모양이 불규칙하였으나 원형에 가까운 세포들이 많았는데, 특히 간실질세포인지 Kupffer세포인지 정확하게 확인되지 않았다. TGF-β_1의 기원세포에 대해서는 많은 상반된 연구가 있으며 아직도 확실하게 알려져 있지 않다. Kupffer세포와 간성상세포에서만 분비되고 간실질세포에서는 분비되지 않는다는 보고가 있는가 하면,[3,25] 간실질세포에서도 면역화학적 검사시 불활성형 TGF-β_1이 양성으로 나온다는 보고가 있다.[26-28] 본 연구에서의 TGF-β_1 기원세포를 알아보기 위해서는 추후에 Kupffer세포, 간성상세포 및 간세포를 구분할 수 있는 특수 염색이, 예를 들어 Kupffer세포에 특이한 CD68 염색이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

목적: 사염화탄소(CCl_4)의 단기 투여로 급성 간손상을 유발시킬 수 있고 이것은 간섬유화의 초기 단계를 연구하는데 이용되고 있으나 그 기전에 대해서는 아직 확실하게 알려져 있지 않다. CCl_4는 산화제(pro-oxidant)로서의 기능이 중요할 것으로 생각되고, CCl_4 투여 후 발현이 증가되는 간섬유화 인자인 transforming growth factor-β_1 (TGF-β_1)도 핵심적인 역할을 할 것으로 생각되나, 급성 산화성 스트레스와 TGF-β_1과의 관계는 아직 확실하게 정립되어 있지 않다. 또한 CCl_4를 이용한 급성 간손상 모델에서 어느 시기에 간손상이 유발되고 TGF-β_1이 발현되는지 시간에 따른 변화도 아직 확실하게 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 CCl_4의 일회 투여로 급성 간손상을 유발하여 간손상 정도를 나타내는 혈청 alanine aminotransferase(ALT) 농도 및 혈청과 간조직에서의 TGF-β_1의 시간에 따른 변화를 관찰하고, 항산화제인 비타민 E를 투여하여 이에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. **대상과 방법**: 몸무게 100 g 정도의 Sprague-Dawley 흰쥐 수컷 60마리를 30마리씩 두 군으로 나누어 1군은 CCl_4만을 복강내에 투여하였고, 2군은 CCl_4를 복강내에 투여하고, CCl_4 투여 2일 전부터 희생시킬 때까지 매일 비타민 E를 복강내에 투여하였다. CCl_4 투여 전과 투여 후 8, 16, 32, 48 및 60시간에 두 군에서 각각 5마리씩의 흰쥐를 희생하여 혈청 ALT 농도, 혈청 TGF-β_1 농도 및 간조직에서의 TGF-β_1의 발현을 측정하였다. **결과**: 혈청 ALT치는 두 군 모두에서 CCl_4 투여 후 32시간에 가장 의미 있게 증가되었으며 ($p<0.05$), 혈청 TGF-β_1치는 두 군 모두에서 CCl_4 투여 후의 농도치가 투여 전에 비해 통계학적으로 유의한 변화가 없었으며, 면역조직화학적 검사상 TGF-β_1에 양성을 보인 세포의 수는 두 군 모두에서 CCl_4 투여 후 32시간에 가장 많았다($p<0.05$). 비타민 E의 투여에 의해 혈청 ALT치와 간조직에서의 TGF-β_1 발현은 유의하게 억제되었으나 ($p=0.049$),($p=0.015$), 혈청 TGF-β_1 치는 의미 있게 억제되지 못하였다($p=0.11$). **결론**: 본 연구 결과는 CCl_4에 의한 급성 간손상에서 산화성 스트레스와 TGF-β_1의 발현사이에 직상관관계가 있음을 간접적으로 암시해 주고, 또한 비타민 E 투여에 따른 간손상의 감소와 간조직에서의 TGF-β_1 발현의 억제가 비타민 E에 의한 간섬유화 억제 효과의 작용 기전일 가능성을 추정케 한다.

참고문헌

1. Brenner DA, Veloz L, Jaenisch R, Alcorn JM. Stimulation of the collagen α1(I) endogenous gene and transgene in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. Hepatology 1993;17:287-292.
2. Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride-and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. Hepatology 1992;16:992-996.

3. Bedossa P, Houglum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen α1(I) gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury: a link to tissue fibrosis? Hepatology 1994;19:1262-1271.
4. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. Science 1986;233:532-534.
5. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, De Crombrugghe B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J Cell Biol 1987;105:1039-1045.
6. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor β: implication for a pathogenetic role in liver fibrogenesis. Hepatology 1990;11:599-605.
7. Nakatsukasa H, Evarts RP, Hsia CC, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-β_1 and type I procollagen transcripts during regeneration and early fibrosis of rat liver. Lab Invest 1990;63:171-180.
8. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factor β_1 and α in chronic liver disease. N Engl J Med 1991;324:933-940.
9. Armendariz-Borunda J, Seyer JM, Kang AH, Raghow R. Regulation of TGF-β gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. FASEB J 1990;4:215-221.
10. Baroni GS, D'Ambrosio L, Ferretti G, et al. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellate cells. Hepatology 1998;27:720-726.
11. Parola M, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Vitamin E dietary supplementation protects against carbon tetrachloride-induced chronic liver damage and cirrhosis. Hepatology 1992;16:1014-1021.
12. Manna Z, Guopei S, Minuk GY. Effects of hepatic stimulator substance, herbal medicine, selenium/vitamin E and ciprofloxacin on cirrhosis in the rat. Gastroenterology 1996;110:1150-1155.
13. Houglum K, Bedossa P, Chojkier M. TGF-β and collagen-α1(I) gene expression are increased in hepatic acinar zone I of rats with iron overload. Am J Physiol 1994;267:G908-G913.
14. Chen CY, Huang YL, Lin TH. Association between oxidative stress and cytokine production in nikel-treated rats. Arch Biochem Biophys 1998;356:127-132.
15. Horwitt MK. Data supporting supplementation of human with vitamin Eur. J Nutr 1991;121:424-429.
16. Houglum K, Brenner DA, Chojkier M. d-α Tocopherol inhibits collagen α1(I) gene expression in cultured human fibroblasts. J Clin Invest 1991;87:2230-2235.
17. Brenner DA. Transforming growth factor β and hepatic fibrosis: cause or effect? Hepatology 1991;14:740-742.
18. Poli G, Albano E, Dianzani MU. The role of lipid peroxidation in liver damage. Chem Phys Lipids 1987;45:117-142.
19. Biasi F, Albano E, Chiarpotto E, et al. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. Cell Biochem Funct 1991;9:111-118.
20. Lee KS, Buck M, Houglum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF-

α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myb expression. J Clin Invest 1995;96:2461-2468.
21. Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type β transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:2345-2349.
22. Rosensweig JN, Omori M, Page K, et al. Transforming growth factor-β1 in plasma and liver of children with liver disease. Pediatr Res 1998;44:402-409.
23. Tsushima H, Kawata S, Tamura S, et al. Reduced plasma transforming growth factor-beta 1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. J Hepatol 1999;30:1-7.
24. Reinhold D, Bank U, Buhling F, et al. A detailed protocol for the measurement of TGF-β1 in human blood samples. J Immunol Methods 1997;209:203-206.
25. De Blesser P, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-β gene expression in normal and fibrotic rat liver. J Hepatol 1997;26:886-893.
26. 조남훈, 박찬일. 급성 간손상 후 transforming growth factor-β와 혈청 III형 교원질 및 간 재생능의 상관관계와 prostaglandin E2가 이에 미치는 영향. 대한병리학회지 1996;30:367-387.
27. Krull NB, Zimmermann T, Gressner AM. Spatial and temporal patterns of gene expression for the proteoglycans biglycan and decorin and for transforming growth factor-β1 revealed by in situ hybridization during experimentally induced liver fibrosis in the rat. Hepatology 1993;18:581-589.
28. Williams AO, Knapton AD. Hepatic silicosis, cirrhosis, and liver tumors in mice and hamster: studies of transforming growth factor β expression. Hepatology 1996;23:1268-1275.